

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 741**

51 Int. Cl.:

G01N 33/538 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2005** **E 05813531 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015** **EP 1825273**

54 Título: **Ensayo de unión a base de partículas**

30 Prioridad:

03.12.2004 GB 0426592

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.05.2015

73 Titular/es:

**ORION DIAGNOSTICA OY (100.0%)
KOIVU-MANKKAAN TIE 6 B
02200 ESPOO, FI**

72 Inventor/es:

**LUOTOLA, JUHANI;
NIKULA, HANNU y
MURTOVUORI, MIRA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 536 741 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo de unión a base de partículas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la separación de un inmunocomplejo formado o cualquier complejo biomolecular de material no unido sobre una superficie porosa, que es una rejilla o parrilla y comprende agujeros/aberturas compatibles mutuamente con partículas usadas. La invención desvela un inmunoensayo heterogéneo realizado en formato de ensayo con dos partículas donde el tamaño y las diferentes características de las partículas son aprovechados, para detección y cuantificación de un analito en una muestra. En el método, se usan partículas grandes para capturar a partir de una muestra, separar y distinguir dicho analito de fluidos corporales, mientras que se usan partículas pequeñas como medio de marcado.

15 Antecedentes de la invención

Varios métodos usan técnicas de inmunoensayo para la detección y la cuantificación de antígeno en una muestra. Actualmente se usan dos tipos de sistemas de inmunoensayo. En un sistema homogéneo, el ensayo se realiza en una única fase. En un sistema heterogéneo, el inmunoensayo se realiza en dos etapas. La etapa adicional es necesaria para separar el material unido del no unido. Típicamente, se usa una superficie de soporte sólida como una fase unida, a la que se fija un anticuerpo o antígeno mediante adsorción o enlaces químicos. Se han desarrollado muchos tipos de superficies de soporte sólidas para mejorar el rendimiento de una reacción inmunológica y la eficacia de la etapa de separación.

Se han usado partículas como una fase sólida móvil en ensayos de aglutinación para mejorar la eficiencia de la reacción inmunológica entre anticuerpo y antígeno. En dicho sistema, antígenos/anticuerpos solubles se combinarán con anticuerpos/antígenos específicos unidos sobre las partículas dando como resultado precipitados de inmunocomplejos de antígeno-anticuerpo insolubles sobre la superficie de las partículas. En inmunoensayos en fase sólida, la sensibilidad del ensayo puede incrementarse lavando el inmunocomplejo unido a la fase sólida, lo que da como resultado una separación más completa del material no unido y, por lo tanto, el incremento de la relación de señal con respecto a ruido. Adicionalmente, también se han usado micropartículas de diversas composiciones en un esfuerzo por incrementar el área superficial del soporte sólido.

Los ensayos de aglutinación a base de partículas son bien conocidos para los expertos en la materia. Los ensayos de aglutinación originales aprovechaban partículas de un único tamaño como partículas de poliestireno es decir partículas de látex. Un método para superar la baja sensibilidad del ensayo de aglutinación especialmente cuando se ensayan pequeñas cantidades de un analito se desvela en la Patente de Estados Unidos Nº 4.279.617, donde se usan dos reactivos particulados revestidos diferentes. Dichas partículas pueden ser de diferente tamaño. Dicho método no implica una separación de material no unido del aglutinado usando un proceso de filtración.

Los documentos de la técnica anterior reconocen una serie de publicaciones que desvelan técnicas de ensayo que dependen del uso de un miembro poroso tal como una membrana, filtro u otras matrices. La Patente de Estados Unidos Nº 4.632.901, el documento EP-B-180638 y la Patente de Estados Unidos Nº 4.727.019 desvelan un miembro al que está unido un receptor para el analito diana y un segundo miembro para atraer líquido añadido al primer miembro. Cuando se añade una muestra líquida, el líquido fluye a través del miembro y los receptores en éste se unen al analito presente en la muestra. Después de la adición de la muestra, se añade otro receptor para el analito que está marcado para permitir la detección. Siendo marcadores adecuados una enzima, un radionúclido o un marcador fluorescente. Cuando se usa un marcador enzimático, una desventaja es que debe añadirse a la membrana un sustrato que forma una coloración.

El documento EP-B-253579 desvela una realización adicional de la técnica basada en un miembro mencionada anteriormente. La realización aprovecha las microesferas que quedan atrapadas dentro de los intersticios de la membrana porosa para aprovechar un medio para fijar un receptor o antirreceptor al miembro poroso.

La Patente de Estados Unidos Nº 4.916.056, el documento EP-B-389003, la Patente de Estados Unidos Nº 5.008.080 y la Patente de Estados Unidos Nº 5.149.622 desvelan ensayos de flujo pasante a base de membranas que aprovechan partículas sobre las que han sido retenidos anticuerpos o antígenos. El tamaño de las partículas no es vital aunque se prefiere que el tamaño sea más pequeño que el tamaño de poro promedio de la matriz fibrosa.

Habitualmente se usan membranas tridimensionales para la separación de un inmunocomplejo de material no unido. La Patente de Estados Unidos Nº 5.501.949 desvela un inmunoensayo que usa partículas finamente divididas como una fase sólida como el primer componente (sustancia) de unión. Los segundos componentes de unión solubles están marcados con un material que genera señales. El componente de unión marcado, no unido a partículas, soluble usado en este método tiene una menor actividad específica en comparación con el componente de unión marcado con un marcador unido a partículas. Esto da como resultado la pérdida de sensibilidad del ensayo. El método usa una membrana tridimensional para filtrar el inmunocomplejo y separar el material no unido.

La Patente de Estados Unidos N° 4.853.335 desvela un inmunoensayo donde una muestra biológica, ligando o antiligando marcado con oro coloidal, y partículas de captura de fase sólida revestidas con ligando o antiligando se aplican sobre una película porosa. Las partículas capturadas sobre la membrana son inspeccionadas visualmente para ver su color.

La solicitud de británica N° 2123146 describe un método de ensayo realizado en un contador de células óptico-eléctrico de doble canal o en un microscopio de fluorescencia. La divulgación implica primera y segunda partículas microscópicas que tienen diferentes propiedades detectables realizando dichos métodos de ensayo. Dicha solicitud no desvela ninguna separación de material unido del aglutinado usando un proceso de filtración. Un fluido biológico se entremezcla con las partículas, y seguidamente se miden sus diferentes propiedades.

La Patente de Estados Unidos N° 5.565.366 comprende un método donde se forma una mezcla de prueba poniendo en contacto a una muestra con partículas coloreadas que portan sobre su superficie receptores específicos para el ligando. Cuando se hace pasar a la mezcla de prueba a través de un filtro que tiene aberturas más grandes que las partículas pero más pequeñas que los agregados, los agregados se eliminan del filtrado y el color del filtro/filtrado se analiza. El documento desvela que el pequeño tamaño de partícula usado es más ventajoso con respecto a la formación de agregados que partículas más grandes usadas en técnicas de la técnica anterior. Sin embargo, el uso de partículas pequeñas es desventajoso, dado que el consumo de ligando o antiligando sobre la partícula es mayor cuanto más pequeñas son las partículas.

La Patente de Estados Unidos N° 6.268.222 desvela un enfoque diferente donde micropartículas se fijan a nanopartículas marcadas con colorante de fluorescencia. Las partículas se fijan entre sí mediante sus grupos funcionales en superficie. Esta invención comprende una partícula central o portadora que tiene sobre su superficie una pluralidad de partículas poliméricas más pequeñas. Cuando se usan diferentes colorantes de fluorescencia, se obtiene una emisión de fluorescencia múltiple mediante una excitación de una fuente de luz. Modificando la cantidad y la relación de diferentes poblaciones de nanoesferas, es posible establecer y distinguir un gran número de poblaciones discretas de partículas portadoras con espectros de emisión únicos. Este enfoque es útil para análisis múltiple de una pluralidad de analitos en una muestra.

Tal como se ha desvelado en la anterior revisión de la técnica anterior, se han usado partículas en solitario o junto con diferentes aplicaciones de membranas tridimensionales para separar analitos deseados a partir de una muestra. Sin embargo, a menudo existe la unión inespecífica de sustancia de unión marcada debido a la porosidad de la membrana. Por lo tanto, la relación de señal con respecto a ruido es baja, debido a una elevada señal de fondo, cuando se usan membranas tridimensionales. Por lo tanto, las membranas tridimensionales requieren un lavado considerable para reducir la unión inespecífica.

Además de los métodos desvelados anteriormente, ensayos que aprovechan, por ejemplo, perlas magnéticas también son bien conocidos para los expertos en la materia.

Los métodos desvelados en los anteriores documentos de la técnica anterior dependen principalmente de la detección visual del analito y no son, por lo tanto, suficientemente sensibles para medir bajas concentraciones de analito. Además, el nivel de señal creado por el marcador no es, en todas las circunstancias, lo suficientemente intenso.

Métodos más sofisticados en la técnica aplican el cambio de corriente eléctrica para indicar la presencia de analito en la muestra. Transistores de efecto de campo revestidos con una capa de anticuerpo en la región de la puerta se utilizan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.238.757 para detectar reacción de antígeno-anticuerpo mediante un cambio de la concentración de carga de la transición.

Un reactivo marcado que reacciona con el complejo analito-reactivo o con el reactivo para cambiar la reactancia eléctrica de la superficie se añade en la Patente de Estados Unidos N° 4.219.335. Una reacción inmunológica también puede medirse mediante un inmunoensayo voltamétrico tal como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 4.233.144, donde un inmunorreactante se marca con una sustancia electroactiva.

La Patente de Estados Unidos N° 4.054.646 desvela un método donde una capa de antígeno-anticuerpo está intercalada entre dos capas conductoras y donde se mide la capacitancia eléctrica del laminado resultante.

Otro tipo de técnica de medición de la capacitancia que aprovecha un par de electrodos revestidos con un sustrato y sumergidos en un medio que contiene un material que se une específicamente con los sustratos se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 4.072.576.

También es posible combinar una detección de señales de efecto de cambio con una técnica de inmunoensayo enzimático, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.287,300.

Sin embargo, los métodos eléctricos anteriores no satisficieron las necesidades de un método sencillo, rápido, sensible, económico y fácil de usar para realizar un ensayo de inmunodiagnóstico.

Un método diseñado para resolver las desventajas mencionadas anteriormente se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 5.284.748 donde se emplean partículas de oro coloidal marcadas con antígeno o anticuerpo opcionalmente con intensificación con plata en un nuevo método de inmunodiagnóstico. El complejo formado de este modo causa la finalización (cierre) completa o parcial de un circuito eléctrico esencialmente abierto. Una realización adicional comprende un par de conductores eléctricos separados, particularmente capas conductoras dispuestas sobre una base sustancialmente no conductora de la electricidad. Hay un espacio entre los conductores definido como una trayectoria o canal. Un medio que forma un circuito eléctrico se pone en contacto con cada uno de los conductores, de modo que el canal constituya una brecha en el circuito. La reacción de unión entre el par de sustancias es responsable de salvar completa o parcialmente la brecha en el circuito. Un dicho medio implica adherir una de las sustancias a las superficies de partículas conductoras de la electricidad.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para detectar la presencia o cantidad de un analito en una muestra. La invención emplea partículas de captura móviles revestidas con una primera sustancia de unión (es decir, primer componente de unión) y partículas marcadas de forma detectable revestidas con una segunda sustancia de unión (es decir, segundo componente de unión). Ambas sustancias de unión son un ligando o antiligando específico sobre el cual se une la molécula de analito (ligando o antiligando) si está presente en la muestra.

La presente invención aprovecha dichas partículas y depende del uso de una superficie porosa, es decir un medio de separación, que es una rejilla o una parrilla. A diferencia de la técnica anterior, la presente invención aprovecha el uso de partículas de captura sobre las cuales se ha unido una sustancia de unión específica para el analito en la muestra. El complejo producido será retenido sobre la superficie porosa cuando se aplique sobre ella. Por consiguiente, el complejo que consta de primer componente de unión-analito-segundo componente de unión o primer componente de unión-analito se separa del material no unido sobre la superficie del medio de separación. En consecuencia, este procedimiento también puede usarse para la separación y el enriquecimiento del analito. Dicho analito enriquecido puede usarse a continuación para procedimientos y estudios adicionales.

Dicha superficie porosa puede formar la parte básica de un dispositivo que adicionalmente puede comprender un marco, sujetador u otro soporte que forma, por ejemplo, una cubierta de ensayo (cartucho).

Para la generación de un flujo de líquido intensificado para eliminar material no unido, puede usarse una membrana con acción de capilaridad y/o una presión negativa o positiva o una fuerza externa (por ejemplo ultrasonidos).

La presente invención aprovecha medios de separación bidimensional y tridimensional para la segregación de los inmunocomplejos/complejos biomoleculares formados de material no unido después de inmunorreacciones o reacciones químicas. En dichos medios de separación, la segregación del inmunocomplejo /complejo biomolecular se produce sobre la superficie del medio de separación. Curiosamente, la superficie porosa desvelada permite una separación de dichos complejos de forma bidimensional sobre la superficie, mientras que pequeñas partículas de marcador y otros materiales no unidos al penetrar en la superficie son distribuidas de forma tridimensional. En consecuencia, es posible una separación tanto bidimensional como tridimensional usando dicha superficie porosa. Por lo tanto, en caso necesario, es posible liberar los inmunocomplejos/complejos biomoleculares producidos de la superficie y transferirlos de acuerdo con necesidades adicionales. El propio analito o algún otro componente celular pueden caracterizarse adicionalmente por ejemplo mediante PCR o mediante cualquier otro método bioquímico o de biología molecular que sea bien conocido para los expertos en la materia.

La presente invención supera las deficiencias de sensibilidad de métodos de la técnica anterior aprovechando partículas no marcadas y marcadas de diferente tamaño y una superficie porosa. Un problema habitual con el marcador usado en métodos de la técnica anterior es que tiene una intensidad de señal y una relación inapropiada de señal con respecto a ruido. El tamaño de las partículas de captura con respecto a partículas marcadoras en la presente invención se optimiza para consumir una cantidad más pequeña pero todavía óptima de ligando o antiligando en comparación con partículas pequeñas. De acuerdo con la presente invención, debido a la elevada unión al marcador inespecífica, pueden reducirse elevados recuentos de marcador de fondo, usando una superficie porosa, que posee baja unión al marcador inespecífica, para la separación del inmunocomplejo del material no unido. Además, la sensibilidad del ensayo puede incrementarse usando una sustancia de unión fijada a partículas de marcador, incrementando de este modo la actividad específica de la sustancia de unión marcada y la sensibilidad del ensayo.

En particular, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia o cantidad de un analito en una muestra, comprendiendo dicho método: (a) aplicar a una superficie porosa un primer componente de unión que comprende partículas que tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente a dicho analito; (b) aplicar dicha muestra a dicha superficie porosa; (c) aplicar a dicha superficie porosa un segundo componente de unión que comprende partículas marcadas de forma detectable; y (d) detectar una señal producida por dichas partículas marcadas de forma detectable sobre dicha superficie porosa que es indicativa de la presencia y/o la cantidad de dicho analito en dicha muestra; donde dicha superficie porosa es una rejilla o parrilla; donde dicha superficie porosa permite que dicho segundo componente de unión pero no que dicho primer componente de unión

pase a través de dicha superficie; donde dicho primer componente de unión y dicho analito se unen entre sí para formar un primer complejo de unión; donde dichas partículas marcadas de forma detectable tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente a dicho analito o dicho primer componente de unión y dicho analito, de modo que dicho segundo componente de unión y dicho primer complejo de unión se unen entre sí para formar un segundo complejo de unión; y donde el primer complejo de unión y/o el segundo complejo de unión es retenido sobre la superficie porosa. En una realización, la muestra y el primer componente de unión se ponen en contacto entre sí antes de ser aplicados a la superficie. En otra realización, la etapa (a) se lleva a cabo antes de la etapa (b). En una realización adicional, la muestra, el primer componente de unión y el segundo componente de unión, se ponen en contacto entre sí antes de ser aplicados a la superficie. En una realización adicional más, la etapa (b) se lleva a cabo antes de la etapa (a).

La invención también proporciona un kit para detectar la presencia y/o cantidad de un analito en una muestra, que comprende:

- (a) una superficie porosa;
- (b) un primer componente de unión que comprende partículas que tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente a dicho analito para formar un primer complejo de unión; y
- (c) un segundo componente de unión que comprende partículas marcadas de forma detectable que tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente a dicho analito o dicho primer componente de unión y dicho analito, de modo que dicho segundo componente de unión y dicho primer complejo de unión se unen entre sí para formar un segundo complejo de unión;

donde dicha superficie porosa es una rejilla o una parrilla; y donde el primer complejo de unión y/o el segundo complejo de unión son capaces de ser retenidos sobre la superficie porosa.

También se describe en el presente documento un dispositivo de separación para separar un inmunocomplejo u otro complejo biomolecular de material no unido después de la formación de dicho complejo, conteniendo dicho dispositivo una superficie porosa montada en dicho dispositivo, donde dicha superficie porosa es una rejilla o una parrilla.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 desvela el principio de ensayo para la formación de un inmunocomplejo.
- La figura 2 desvela la separación bidimensional de dicho complejo sobre la rejilla.
- La figura 3 desvela la separación tridimensional de material no específico no unido mediante filtración de dicho material a través de la rejilla.
- La figura 4 describe un gráfico que muestra la concentración de hCRP en una muestra.
- La figura 5 describe un gráfico que muestra la concentración de hSHBG en una muestra.
- La figura 6 muestra la separación de un segundo componente de unión no unido (B) de un segundo componente de unión unido al primer componente de unión (C) usando una estructura de parrilla (A).

Descripción detallada de los dibujos

La figura 1 desvela un método ejemplar para la formación de un inmunocomplejo. La figura describe cómo el primer componente de unión, junto con el segundo componente de unión, forman dicho inmunocomplejo. En primer lugar, partículas de captura (1) revestidas con una sustancia de unión (2), habitualmente un ligando o un antiligando, forman el primer componente de unión. Las partículas trazadoras (3) y una sustancia de unión (2), habitualmente un ligando o un antiligando, forman el segundo componente de unión. En segundo lugar, estos componentes de unión se aglutinarán cuando entren en contacto con un analito (4), habitualmente un ligando o un antiligando, presente en una muestra dando como resultado la formación de dicho inmunocomplejo (5).

La figura 2 muestra una vista frontal de cómo se produce la filtración bidimensional después de aplicar los inmunocomplejos (5) sobre la rejilla (6). Un patrón de agujeros cuadrados (7) forma la estructura básica de la rejilla.

La figura 3 muestra una vista lateral de los inmunocomplejos retenidos (5) sobre la rejilla (6), la dirección de filtración tridimensional de partículas trazadoras filtradas (3) y material no específico no deseado (8).

La figura 4 desvela un gráfico que muestra los resultados de un ensayo que usa hCRP como analito y partículas de captura y marcadoras revestidas con fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos policlonales para la formación de un inmunocomplejo y la separación de dicho complejo sobre la rejilla. El intervalo de ensayo para hCRP es de 0,08 - 10 mg/l.

La figura 5 desvela un gráfico que muestra los resultados del ensayo usando hSHBG como analito y partículas de captura y marcadoras revestidas con dos anticuerpos monoclonales diferentes para la formación de un inmunocomplejo y la separación de dicho inmunocomplejo sobre la rejilla. El intervalo de ensayo para hSHBG es de 6 - 200 nmol/l.

La figura 6 muestra la separación de un segundo componente de unión no unido de un segundo componente de unión unido a un primer componente de unión usando una estructura de parrilla. Los complejos que contienen los segundo y primer componentes de unión (C) no pueden pasar a través de la parrilla (A). El segundo componente de unión no unido (B) puede pasar a través de la parrilla. En un caso ideal, los puntos tangenciales de la parrilla y las partículas de captura del primer componente de unión (D) se aproximan a 0.

Definiciones usadas

Los conceptos usados en la presente invención y descritos en el presente documento tienen los siguientes significados aplicados:

- sustancia de unión - cualquier molécula, ligando o antiligando, compuesto, o combinación de los mismos capaz de reconocer y unirse a la parte distinta de la molécula específica (por ejemplo epítopo o determinante antigénico);
- ligando o antiligando - una molécula que forma un complejo con otra molécula, tal como un antígeno o anticuerpo usado en un inmunoensayo;
- primera sustancia de unión - una sustancia de unión que se extiende o se extenderá formando un revestimiento sobre partículas de captura;
- segunda sustancia de unión - una sustancia de unión que se extiende o se extenderá formando un revestimiento sobre partículas marcadoras;
- partícula de captura - partícula sólida compuesta por cualquier tipo de polímero, plástico, vidrio, metal, celulosa o similares, usada como una fase sólida o portador para la sustancia de unión que, por consiguiente, se hace insoluble; como alternativa, diferentes materiales no sólidos (elásticos) como liposomas, células, microorganismos que incluyen virus pueden funcionar como partículas de captura;
- marcador - una sustancia que genera o a la que se le puede hacer generar una señal capaz de ser detectada o medida mediante un medio visual o de instrumentación;
- partícula marcadora - partícula sólida compuesta por cualquier tipo de polímero, plástico, vidrio, metal, celulosa o similares, que está marcada de forma detectable; como alternativa, diferentes materiales no sólidos (elásticos) como liposomas, células, microorganismos que incluyen virus pueden funcionar como partículas marcadoras;
- primer componente de unión - un componente que comprende partículas de captura revestidas con una primera sustancia de unión;
- segundo componente de unión - un componente que comprende partículas marcadoras revestidas con una segunda sustancia de unión;
- componentes de unión - se refiere a un primer componente de unión y/o un segundo componente de unión;
- primer complejo de unión - se refiere a un complejo entre un primer componente de unión y un analito;
- segundo complejo de unión - se refiere a un complejo entre un primer complejo de unión (un primer componente de unión y un analito) y un segundo componente de unión;
- tercer complejo de unión - se refiere a un complejo entre un segundo componente de unión y un analito;
- inmunocomplejo u otro complejo biomolecular - un primer, segundo o tercer complejo de unión;
- analito - un compuesto o sustancia cuya presencia en una solución de muestra se evaluará cuantitativa o cualitativamente y que contiene al menos una disposición espacial o polar única capaz de ser reconocida y de que se una a ella una sustancia de unión; el analito puede estar libre (independiente) en solución o unido, por ejemplo, a membranas celulares;
- dispositivo de separación - un dispositivo que encierra una superficie porosa montada en dicho dispositivo;
- superficie porosa - superficie usada para la separación de un inmunocomplejo u otro complejo biomolecular de material no unido que permite que el segundo componente de unión y otro material no unido, pero no el primer componente de unión, pase a través de la superficie; la superficie porosa no permite que ninguno del primer o el segundo complejo de unión pase a través de la superficie; la superficie porosa comprende agujeros o aberturas;
- agujeros o aberturas - estos términos se usan de forma intercambiable en el presente documento; los agujeros/aberturas son el medio mediante el cual el segundo componente de unión y otro material no unido pasan a través de la superficie porosa;
- tamaño del agujero/abertura - esto se refiere a la dimensión del agujero/abertura que limita la capacidad de una partícula o material de pasar a su través; el tamaño puede referirse, por ejemplo, al diámetro promedio de un agujero/abertura o la distancia entre dos lados paralelos de un agujero/abertura;
- tamaño de la partícula - esto se refiere a la dimensión de la partícula que limita su capacidad de pasar a través de un agujero/abertura; el tamaño puede referirse, por ejemplo, al diámetro promedio de una partícula esférica;
- medio de separación o montaje - usado con el mismo significado que superficie porosa;
- rejilla, parrilla - superficie porosa que tiene agujeros o aberturas con dimensiones relativas al tamaño de partículas;
- formato bidimensional - el material se mueve lateralmente sobre la superficie porosa, dado que es incapaz de pasar a través de la superficie; partículas más grandes que el tamaño de los agujeros/aberturas en la superficie porosa se separarán de forma bidimensional; el primer componente de unión, el primer complejo de unión y el segundo complejo de unión experimentan separación bidimensional;
- formato tridimensional - el material se mueve lateralmente sobre la superficie porosa y verticalmente a través de

la superficie porosa, dado que es capaz de pasar a través de la superficie; partículas más pequeñas que el tamaño de los agujeros/aberturas en la superficie porosa se separarán de forma tridimensional; el segundo componente de unión experimenta separación tridimensional.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención usa una superficie porosa que es una rejilla o una parrilla como medio de separación de un inmunocomplejo u otro complejo biomolecular de material no unido después de la formación de dicho complejo. La segregación del complejo se produce estrictamente sobre la superficie de la superficie porosa (medio de separación).

El uso de partículas de captura permite el uso de una superficie porosa con agujeros/aberturas que tienen un tamaño que retiene al primer componente de unión, el primer complejo de unión y el segundo complejo de unión sobre la superficie porosa pero permite que el segundo componente de unión y otro material no deseado pasen a través de la superficie. El tercer complejo de unión será retenido sobre la superficie porosa o pasará a través de la superficie porosa.Cuál de estas opciones se aplica depende de la forma y el tamaño del agujero/abertura.

La separación de dichos complejos sobre una superficie porosa a partir de material no unido se hace posible mediante el uso de partículas de captura que permiten el uso de una superficie porosa con poros de mayor tamaño que si solamente se usaran segundos componentes de unión (partículas marcadoras revestidas con sustancia de unión). El tamaño y la forma de los agujeros/aberturas de la superficie porosa son vitales. Esto se describe con más detalle a continuación. Los expertos en la materia reconocen que las partículas tienen una tendencia a la autoaglutinación, causando resultados falsos positivos. Por lo tanto, el tamaño de los agujeros debe ser lo suficientemente grande para que los segundos componentes de unión autoaglutinados pasen a través de la superficie porosa, permitiendo solamente una señal específica procedente del segundo complejo de unión que indica la presencia de un analito en la muestra a estudiar. Por consiguiente, el tamaño del agujero debe ser tal que las partículas autoaglutinadas no obstruyan el agujero. Además, la forma del agujero debe ser tal que las partículas de captura usadas no taponen el agujero.

La superficie porosa y especialmente los agujeros/aberturas de la misma deben ser compatibles con el tamaño y la forma de la partícula de captura. El agujero y la partícula de captura forman un todo funcional que debe optimizarse para retener la partícula de captura revestida con sustancia de unión (primer componente de unión) sobre la superficie porosa sin obstruir el agujero. Los agujeros de la superficie porosa deben, en todas las circunstancias, mantener su capacidad para permitir que el segundo componente de unión no unido y otro material no deseado pasen a través de dicha superficie. Esto se consigue diseñando un par de agujero-partícula de captura funcional donde los puntos de contacto tangencial entre la partícula de captura y el borde del agujero son, tanto numéricamente como con respecto al tamaño del área de contacto, lo más pequeños posible.

La presente invención es especialmente adecuada para determinar bajas concentraciones de analito en una muestra. Cuando una cantidad secundaria de analito se fija a la sustancia de unión expuesta a una muestra que tiene una baja concentración de dicho analito, no es posible determinar esta pequeña cantidad de aglutinación con métodos convencionales. De acuerdo con la presente invención, es posible determinar dicho analito aprovechando la señal de alta intensidad de la partícula marcadora. Tal como se ha mencionado, una pequeña cantidad de aglutinación es insuficiente para permitir un resultado preciso y fiable, sin embargo, dicha aglutinación puede medirse aplicando el método de la presente invención. La presente invención no confía en la aglutinación formada *per se* sino que depende de la señal del marcador cuya intensidad se incrementa en proporción con la cantidad de aglutinación producida. Esto se vuelve evidente cuando se compara un ensayo inmunoturbidimétrico convencional con la presente invención.

Una prueba de aglutinación típica aprovecha partículas del tamaño de 0,1 - 1,0 μm y una cantidad muy precisa de sustancia de unión extendida formando un revestimiento sobre ellas. La concentración óptima de partículas revestidas con sustancia de unión permite que se produzca una aglutinación visible. La presente invención desvela un método donde la concentración de sustancia de unión usada para revestir la partícula de captura o marcadora puede reducirse considerablemente. La razón por la cual dicha reducción es posible se basa en el uso de un marcador que genera una señal intensa que se incorpora en la partícula marcadora. Como resultado de la generación de la señal intensa, se consigue una señal incluso cuando solamente una pequeña cantidad de analito ha sido capturada por un número reducido de sustancia de unión sobre la superficie de partículas de captura. Por consiguiente, debido a dicha capacidad de generación de señal intensa, también una pequeña cantidad de partículas marcadoras revestidas con sustancia de unión son suficientes para una medición fiable.

La invención aprovecha una alta concentración de marcador que genera señales (no medible en dispositivos de respuesta umbral baja convencionales debido al flujo excesivo de señales) y un dispositivo de respuesta umbral alta. El resultado fue inesperado, dado que la cantidad de moléculas marcadoras usadas es tan alta que se produce un flujo excesivo de señales en dispositivos convencionales, mientras que la cantidad estaba dentro de límites medibles cuando el ensayo se realizaba de acuerdo con la presente invención.

Habitualmente una pequeña cantidad de moléculas marcadoras puede unirse a un anticuerpo o antígeno. La presente invención desvela un método donde las partículas marcadoras funcionan como un portador de numerosas moléculas marcadoras lo que da como resultado una señal altamente intensa y una mayor sensibilidad. El resultado era una sensibilidad incrementada cuando se usan dispositivos adecuados por ejemplo para pruebas de diagnóstico inmediato. El ensayo fluorimétrico desvelado en la presente solicitud puede realizarse usando un dispositivo de bajo coste moderadamente sensible en comparación con un instrumento de clase de laboratorio de elevado coste que se utiliza habitualmente cuando se realizan estos tipos de ensayos sin ninguna intensificación de partículas. Además, este formato de ensayo permite que numerosos diseños electro-ópticos se incorporen en dispositivos de bajo coste, especialmente para ensayos de tipo de diagnóstico inmediato.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para detectar la presencia o cantidad de un analito en una muestra, comprendiendo dicho método: (a) aplicar a una superficie porosa un primer componente de unión que comprende partículas que tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente a dicho analito; (b) aplicar dicha muestra a dicha superficie porosa; (c) aplicar a dicha superficie porosa un segundo componente de unión que comprende partículas marcadas de forma detectable; y (d) detectar una señal producida por dichas partículas marcadas de forma detectable sobre dicha superficie porosa que es indicativa de la presencia y/o la cantidad de dicho analito en dicha muestra; donde dicha superficie porosa es una rejilla o una parrilla; donde dicha superficie porosa permite que dicho segundo componente de unión, pero no que dicho primer componente de unión, pase a través de dicha superficie; donde dicho primer componente de unión y dicho analito se unen entre sí para formar un primer complejo de unión; donde dichas partículas marcadas de forma detectable tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente a dicho analito o un primer componente de unión y dicho analito, de modo que dicho segundo componente de unión y dicho primer complejo de unión se unen entre sí para formar un segundo complejo de unión; y donde el primer complejo de unión y/o el segundo complejo de unión es retenido sobre la superficie porosa.

El método de ensayo puede realizarse después de la reacción completada en un tubo o cubeta aplicando todos los componentes de reacción, en una adición sobre la superficie porosa. Como alternativa, el método de ensayo puede realizarse aplicando el primer complejo de unión sobre la superficie y seguidamente el segundo componente de unión. Preferentemente, todos los componentes de reacción se aplican en una adición.

El método de ensayo también puede realizarse aplicando en primer lugar la muestra o el primer componente de unión sobre la superficie, seguido por el segundo componente de unión. Este orden plantea exigencias especiales, sobre la hidrofobicidad y el tamaño de poro de la superficie porosa. En dicha aplicación la muestra y los segundos componentes de unión no deben ser capaces de pasar a través de los poros ante de la reacción completada en presencia de analito en la muestra. Seguidamente, el material no unido debe tener un paso libre a través de la superficie, generado mediante cualquier medio. Se plantean aún más exigencias sobre el rendimiento del ensayo cuando la muestra o cualquier otro componente lo suficientemente pequeño para pasar a través de los agujeros/aberturas de la superficie porosa se aplica sobre dicha superficie. El escape de la muestra y otros componentes pequeños a través de los agujeros/aberturas pueden prohibirse temporalmente mediante bloqueo mecánico o fisicoquímico.

Un ensayo donde todos los reactantes se entremezclan es más complicado debido a que una reacción entre el analito y el segundo componente de unión puede dar como resultado un tercer complejo de unión. En dicho ensayo, la reacción entre el analito y el segundo componente de unión se produce simultáneamente con la reacción entre el analito y el primer componente de unión. Sin embargo, los terceros complejos de unión conservan su capacidad de unirse al primer componente de unión a través del analito.

Se han usado partículas como superficie de captura en el inmunoensayo en fase sólida del método de la invención para incrementar el área superficial para la unión. Usando pequeñas partículas marcadas de forma detectable que están suspendidas en la solución de reacción, puede conseguirse una cinética de reacción favorable a través de movimiento Browniano incrementado. Por consiguiente, el equilibrio puede establecerse más rápido que en un sistema con menos área superficial disponible para la unión.

Cuando se realiza el inmunoensayo mediante procedimientos en fase sólida, el material se eliminará de la fase líquida. Cuando el lavado se realiza posteriormente en la fase sólida, se obtiene una separación más completa y la sensibilidad global del ensayo se incrementa.

La presente invención aprovecha micropartículas o nanopartículas sobre las que está fijada una sustancia o sustancias de unión. Las partículas funcionan, por un lado, como una fase sólida móvil y, por otro lado, como un marcador en un procedimiento de inmunoensayo heterogéneo. Especialmente, las partículas ayudan a la separación del complejo resultante cuando se usa una superficie porosa.

Las partículas de captura del primer componente de unión son preferentemente grandes (típicamente de tamaño micrométrico). Las partículas marcadas de forma detectable del segundo componente de unión son preferentemente pequeñas (típicamente de tamaño nanométrico). Sin embargo, las dimensiones de las partículas y los agujeros/aberturas pueden reducirse suponiendo que la relación de tamaño entre las partículas de captura y

marcadoras se mantiene. Las partículas del primer componente de unión preferentemente tienen un diámetro promedio más grande que las partículas del segundo componente de unión. La separación del complejo resultante formado entre dichos componentes de unión y el analito en la muestra del material no unido se realiza usando una superficie porosa. Cuando se separa, la mayoría de la superficie de la partícula está sobre la superficie del medio de separación.

Las partículas de captura pueden estar hechas de cualquier material sólido (por ejemplo plástico, vidrio, metal) o no sólido (es decir elástico como liposomas, células, microorganismos que incluyen virus) que pueda revestirse con una sustancia de unión. Las partículas marcadoras también pueden estar hechas de cualquier material sólido o no sólido en el/sobre el que un marcador o material que genera un marcador puede incorporarse o fijarse y que puede revestirse con una sustancia de unión marcada o no marcada. El tamaño de las partículas de captura está limitado tanto por los requisitos del material de separación como por sus propiedades. Las partículas de captura revestidas de sustancia de unión deben ser lo suficientemente grandes para ser retenidas sobre la superficie porosa tanto antes como después de la formación de primer y/o segundo complejos de unión que resultan de la inmunorreacción o reacción química sobre dicha superficie porosa. Por otro lado, el tamaño de partículas tanto de captura como marcadoras debe ser lo suficientemente pequeño para ser suspendidas en solución y para incrementar la superficie de unión.

Tal como ya se ha mencionado, el factor limitante para el tamaño de las partículas de captura es el tamaño de la abertura o agujero de la superficie porosa. Las partículas de captura deben ser lo suficientemente grandes para que no pasen a través de los agujeros/aberturas, mientras que las partículas marcadoras deben ser lo suficientemente pequeñas para pasar a través de los agujeros/aberturas. Un tamaño de partícula adecuado varía entre un diámetro promedio de 0,1 μm a 200 μm . El tamaño más preferido para la partícula de captura es un diámetro promedio entre 1 - 10 μm . El tamaño de las partículas marcadoras es claramente más pequeño que el de las partículas de captura y estas partículas marcadoras pasan a través de la superficie porosa (por ejemplo rejilla) cuando no están unidas al complejo (primero de unión) partícula de captura-analito. El tamaño de las partículas marcadoras puede variar entre un diámetro promedio de 1 - 1000 nm, estando el diámetro promedio más preferido entre 50 - 150 nm. Un diámetro promedio preferible de las partículas de captura es el tamaño micrométrico, mientras que, un tamaño nanométrico es más adecuado para el diámetro promedio de las partículas marcadoras.

Como ejemplo, cuando se usan micropartículas de captura con un diámetro promedio de 10 μm como en la presente invención, la cantidad preferible de estas partículas varía entre 4×10^3 - 3×10^6 por prueba, siendo la cantidad más preferidas 2×10^4 - 2×10^5 . Cuando se usan partículas de captura dentro de dicho intervalo de cantidad, la cantidad preferible de partículas marcadoras con un diámetro promedio de 100 nm varía entre 1×10^8 - 2×10^9 por prueba.

Las partículas marcadoras que comprenden una señal o material que genera señales y la segunda sustancia de unión se usan para incrementar la actividad específica del material marcador. Por consiguiente, el uso de estas partículas marcadoras incrementa la sensibilidad del ensayo. Sustancias luminiscentes, radiomarcadas, magnéticas o cromógenas pueden incorporarse o fijarse en/a partículas y usarse como un marcador o material que genera señales. Las partículas que contienen marcadores fluorescentes estabilizados que comprenden un quelado de tierra rara se han usado para marcar inmunorreactivos tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.283.382, la Patente de Estados Unidos N° 4.259.313 y la Patente de Estados Unidos N° 4.735.907. Estos marcadores muestran una eficiencia mejorada en fluorescencia y son particularmente útiles en inmunoensayos. Estos marcadores también muestran alta sensibilidad que acompaña a su uso en espectroscopia por fluorescencia. Además de lantánidos tales como europio, terbio, samario, iterbio también pueden usarse otros marcadores luminiscentes, como fluorescentes (por ejemplo fluoresceína y rodamina), fosforescentes (por ejemplo porfirinas), quimioluminiscentes (por ejemplo éster de acridinio, luminol), electroquimioluminiscentes, bioluminiscentes, así como radiomarcadores, cromógenos tales como colorantes insolubles o solubles en agua o marcadores magnéticos (ferritas, magnetitas), aunque sin estar restringidos a estos, en la producción de materiales de marcado específicos de acuerdo con la invención.

Además, la invención puede extenderse a cubrir un formato de ensayo multiparámetro que aprovecha sustancias de unión con diferente especificidad extendidas formando un revestimiento sobre la misma o diferente partícula o partículas de captura, y marcadores con diferentes características.

La presencia de una señal procedente de las partículas marcadoras en el segundo complejo de unión se correlaciona con la presencia del analito en la muestra. La magnitud de la señal obtenida se correlaciona con la cantidad de inmunocomplejo (segundo de unión)/complejo biomolecular generado y, por lo tanto, con la cantidad de analito presente en la muestra. La invención preserva el uso de un marcador también en forma molecular o cualquiera sólida. El nivel de la señal puede medirse mediante instrumentos apropiados como fluorómetros, luminómetros, contadores de radiactividad, magnetómetros y espectrofotómetros.

Las partículas marcadas de forma detectable tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente al primer complejo de unión. Una sustancia de unión "se une específicamente" al primer complejo de unión cuando se une al primer complejo de unión con afinidad preferencial en comparación con otros complejos o sustancias. La sustancia de unión se une específicamente al analito o al primer componente de unión y al analito. La

sustancia de unión preferentemente se une específicamente al analito.

En una inmunorreacción asistida por partículas, tal como se desvela en la presente invención, una primera sustancia de unión está unida sobre la superficie de la partícula de captura y una segunda sustancia de unión está unida a partículas en/a las que la señal o sustancia que genera señales se ha incorporado o fijado. Tanto la partícula de captura como la partícula marcadora hacen a la sustancia de unión insoluble. Típicamente, la sustancia de unión es un anticuerpo o fragmento, por ejemplo F(ab') y F(ab')₂ o derivado del mismo, que reconoce y se une a un analito en una muestra. En la presente invención, pueden usarse anticuerpos tanto policlonales como monoclonales como sustancias de unión. Las primera y segunda sustancias de unión usadas eran fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos policlonales cuando se determinó CRP como un analito. Cuando SHBG se determinó como un analito, se usaron dos anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades como las primera y segunda sustancias de unión, respectivamente. Los anticuerpos para SHBG estaban representados mediante moléculas de IgG completas que se originan a partir de diferentes clones. Anticuerpos monoclonales como sustancias de unión unidas a partículas sobre la superficie tanto de las partículas de captura así como de las partículas marcadoras otorgan el alto grado de especificidad y sensibilidad asociado con dichos anticuerpos. La sustancia de unión puede estar fijada sobre la superficie de las partículas de captura así como sobre las partículas marcadoras mediante adsorción o unión química covalente usando métodos de acoplamiento que son bien conocidos para los expertos en la materia.

Se prefiere que la sustancia de unión esté unida a las partículas en una cantidad suficiente para revestir sustancialmente la partícula. Por "revestir sustancialmente" se entiende que parte pero no toda el área superficial de la partícula está revestida. Esto retiene el movimiento espacial de la sustancia de unión. El porcentaje mínimo del área superficial de las partículas revestido depende parcialmente del tipo y la intensidad del marcador usado. Cuanto más intenso es el marcador, menos sustancia de unión se necesita sobre partículas de captura. Los ensayos de la presente solicitud relativos a partículas revestidas mediante diferentes cantidades de sustancia de unión se realizaron usando un dispositivo de respuesta umbral baja.

Los ensayos de separación de la presente solicitud se realizaron usando un dispositivo de respuesta umbral alta para la medición de fluorescencia resuelta en el tiempo. Cuando se usaba un dispositivo sencillo menos sensible debían usarse partículas marcadoras a la concentración de aproximadamente 100 veces más alta en comparación con la cantidad de partículas cuando se usaba un dispositivo de respuesta umbral baja más sofisticado. El comportamiento de las partículas revestidas (concerniente a partículas tanto de captura como marcadoras) no es (fundamentalmente) diferente cuando la cantidad de partículas marcadoras en reacción se incrementa por ejemplo en 100 veces.

Tal como ya se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere al uso de una superficie porosa como medio de separación para separar un inmunocomplejo/complejo biomolecular de material no unido después de que se ha producido una inmunorreacción o reacción química. La segregación del inmunocomplejo/complejo biomolecular se produce estrictamente sobre la superficie de la superficie porosa (medio de separación).

El principio del ensayo, tal como se desvela en la presente invención, depende de la separación de partículas de captura y partículas marcadoras sobre una superficie porosa. Esta separación depende generalmente de la forma y el tamaño de las partículas y los agujeros/aberturas en la superficie porosa.

Los agujeros/aberturas pueden ser de cualquier forma, por ejemplo, cuadrada, rectangular, circular, triangular, hexagonal u octagonal. El agujero/abertura preferentemente tiene dos lados paralelos. Los agujeros/aberturas pueden estar formados mediante conexión de los dos lados paralelos mediante dos extremos, cada uno formado a partir de un lado recto de cualquier longitud. Estos extremos pueden estar en ángulos rectos a los lados paralelos, por ejemplo el agujero/abertura es un cuadrado o un rectángulo, o los extremos pueden estar en otros ángulos, por ejemplo el agujero/abertura es un paralelogramo o un rombo. Como alternativa, los agujeros/aberturas pueden formarse mediante conexión de los dos lados paralelos por dos extremos que comprenden, cada uno, más de un lado recto de cualquier longitud. Los lados rectos de estos extremos pueden comprender dos (por ejemplo el agujero/abertura es un hexágono), tres (por ejemplo el agujero/abertura es un octógono), cuatro (por ejemplo el agujero/abertura es un decágono) o más lados rectos. Los múltiples lados rectos que forman estos extremos pueden ser de las mismas o diferentes longitudes. El agujero/abertura puede ser, por lo tanto, de forma regular o irregular. Los extremos pueden estar en ángulos rectos con respecto a los lados paralelos, por ejemplo el agujero/abertura es un cuadrado o un rectángulo, o los extremos pueden estar en otros ángulos, por ejemplo el agujero/abertura es un paralelogramo o un rombo. Los dos lados paralelos pueden estar conectados mediante dos o más lados de cualquier longitud. Como alternativa, los agujeros/aberturas pueden estar formados mediante conexión de los dos lados paralelos por dos extremos, que comprende cada uno lados que forman parte de un círculo, por ejemplo un semicírculo. Como alternativa, los agujeros/aberturas pueden formarse mediante conexión de los dos lados paralelos por dos extremos que comprenden, cada uno, lados irregulares de cualquier forma.

En una realización, los agujeros/aberturas con lados paralelos se extienden casi completamente por la superficie porosa, por ejemplo la superficie porosa es una parrilla. En otra realización, los agujeros/aberturas cubren casi toda la superficie, por ejemplo la superficie porosa es una rejilla. Dichas realizaciones son las más eficientes para el paso de material no unido a través de la superficie, dado que existen pasajes incrementados a través de los cuales el

material puede desplazarse.

El tamaño de la partícula de captura es generalmente más grande que las aberturas/agujeros de la superficie porosa. Además, los agujeros/aberturas de dicha superficie son generalmente más grandes que el tamaño de las partículas marcadoras usadas en cualquier forma en el ensayo. En una realización, la superficie porosa comprende aberturas/agujeros con dos lados paralelos y la distancia entre estos lados es más pequeña que el tamaño de las partículas de captura del primer componente de unión pero más grande que el tamaño de las partículas marcadoras del segundo componente de unión.

La forma preferida de la partícula de captura, compatible con la forma del agujero, es esférica cuando la forma del agujero/abertura tiene dos lados paralelos tal como se ha descrito anteriormente. El diámetro promedio de la partícula de captura esférica es, preferentemente, más grande que la distancia entre los dos lados paralelos. Análogamente, la forma preferida de la partícula marcadora, compatible con la forma del agujero, es esférica cuando la forma del agujero/abertura tiene dos lados paralelos, tal como se ha descrito anteriormente. El diámetro promedio de la partícula marcadora es, preferentemente, más pequeño que la distancia entre los dos lados paralelos.

Si se usa una partícula de captura en forma de barra, entonces la anchura de dicha partícula siempre debe superar el tamaño (por ejemplo, el diámetro promedio o la distancia entre dos lados paralelos) del agujero/abertura. Si se usa una partícula marcadora en forma de barra, entonces la anchura de dicha partícula siempre debe ser menor que el tamaño (por ejemplo, el diámetro promedio o la distancia entre dos lados paralelos) del agujero/abertura.

Un tamaño preferible para una abertura o agujero/abertura de la superficie es al menos dos veces el tamaño de una partícula marcadora. Es importante que el tamaño del agujero/abertura de la superficie esté relacionado con el tamaño de las partículas de captura para impedir que las partículas de captura pasen a través de la superficie porosa (por ejemplo rejilla). El tamaño de agujero/abertura promedio típico (por ejemplo, el diámetro promedio o la distancia entre dos lados paralelos) está entre 0,05 - 100 μm , más preferentemente entre 1 - 20 μm . El tamaño de los agujeros/aberturas (por ejemplo, el diámetro promedio a la distancia entre dos lados paralelos) debe ser el 10 - 90%, preferentemente el 50 - 70% del diámetro de la partícula de captura. El tamaño de la partícula marcadora debe ser como máximo el 50% de, preferentemente el 0,1 - 10% del tamaño (por ejemplo, el diámetro promedio o la distancia entre dos lados paralelos) del agujero. Por ejemplo para un tamaño máximo de partículas de captura de 200 μm , el tamaño máximo del agujero/abertura es de 180 μm .

La mayor parte del primer componente de unión sobresale por encima de la superficie porosa y solamente una parte secundaria se alinea tangencialmente en los agujeros de la superficie porosa. Como resultado, el segundo componente de unión es capaz de moverse libremente a través de la superficie mediante medios pasivos o activos.

Solamente el marcador unido a partículas de captura en el segundo complejo de unión se mide en este ensayo. La inmunorreacción o reacción química que ayuda a la unión de la partícula marcadora a partículas de captura puede tener lugar en un tubo, cubeta o similar o sobre la superficie porosa.

La estructura de la superficie y el material usado no permite ninguna unión dentro de la superficie. Todos los primeros componentes de unión y segundos componentes de unión fijados a estos son retenidos sobre la superficie, mientras que todo el material marcador no unido fluye a través de la superficie. Todo el material separado puede estar retenido sobre o ser liberado de la superficie para análisis cuantitativos del marcador. Habitualmente, la superficie tiene una naturaleza pasiva en la recogida de complejos, inmunocomplejos o complejos biomoleculares. Sin embargo, una superficie porosa (por ejemplo rejilla) también puede tener un papel activo en la generación y/o conducción de señales así como en la retirada de marcador no unido. Un medio adecuado para la generación de señales es, por ejemplo, luminiscencia, radiación electromagnética y magnetometría. Además, es posible permitir que el material de superficie porosa refleje o conduzca la señal desde el segundo componente de unión unido hasta el primer componente de unión mediante medios eléctricos, electromagnéticos o magnéticos. La naturaleza del material de la superficie porosa a seleccionar debe exponer un fondo bajo y una elevada relación de señal con respecto a ruido. Los materiales preferidos que cumplen los requisitos anteriores incluyen, aunque no se limitan a metales, compuestos de silicio y polímeros de fondo bajo. Con la expresión "polímero de fondo bajo" se entiende cualquier material polimérico con muy baja (inespecífica) relación de señal en comparación con la señal generada por el marcador (específico). El polímero de fondo bajo es un polímero que no interfiere en la medición del marcador (señal). Por otro lado, pueden usarse materiales, que también tienen fondo bajo, pero que toman parte activamente en la medición participando en el inicio de la señal específica. Dichos materiales incluyen, aunque sin limitarse a materiales preferentemente usados en placas de microvaloración de fondo de membrana fluorimétrica, por ejemplo Acrowell GHP (Pall-Gelman Laboratory) o Multiscreen-FL, de policarbonato (Millipore).

Los materiales porosos adecuados son bien conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, es preferente que la superficie porosa actúe como guía de luz en aplicaciones de excitación y emisión de luz. Además, las propiedades de conductividad eléctrica y de semiconductor se prefieren en la generación y la recogida de señales eléctricas, mientras que, las propiedades magnetométricas son apropiadas para ensayos magnetométricos.

La superficie porosa es, preferentemente, una rejilla. Una rejilla adecuada es por ejemplo la usada en un microscopio electrónico como el soporte (sujetador) de la muestra. Dichas rejillas microscópicas pueden prepararse por ejemplo a partir de metales como cobre, níquel, aluminio, molibdeno, titanio, plata y/u oro. Además de estos metales también pueden prepararse a partir de cerámicas, vidrio o a partir de materiales más flexibles como diferentes tipos de plásticos y/o silicio.

La estructura de la rejilla puede expresarse en forma de un simple plano en plano, pared de un tubo o paredes de un espacio cerrado, por ejemplo una compuerta. En consecuencia, es posible diseñar y fabricar diversas construcciones donde diferentes estructuras de rejilla están presentes. Las modernas técnicas de micromaquinado como moldeo por microninyección, estampado en caliente o micromaquinado con silicio permiten la realización de rejillas muy complicadas. Las rejillas fabricadas y finalizadas mediante esos procedimientos modernos pueden aplicarse en estructuras de rejilla en dispositivos de diagnóstico analítico modernos de acuerdo con la divulgación de la presente invención.

La separación del inmunocomplejo puede venir precedida por una etapa de lavado después de la primera inmunorreacción entre el analito y el primer componente de unión. La etapa de lavado puede llevarse a cabo en, por ejemplo, tubos antes de aplicar el complejo a la superficie. La etapa de lavado puede incluir la adición de un tampón. El centrifugado y la suspensión de nuevo de las partículas granuladas eliminan material de muestra no unido así como el analito no unido libre especialmente cuando se ponen a prueba concentraciones de analito elevadas. Después de la segunda inmunorreacción entre el complejo primer componente de unión-analito y el segundo componente de unión, los componentes de reacción pueden ser transferidos sobre la superficie porosa (por ejemplo rejilla). Como alternativa, dependiendo de la estructura del medio de separación, ambas inmunorreacciones también pueden ser llevadas a cabo directamente sobre la superficie porosa (por ejemplo rejilla). El lavado también puede conseguirse añadiendo la solución tampón sobre la superficie porosa (por ejemplo rejilla). La solución de lavado (o tampón) es, preferentemente, capaz de pasar a través de la superficie porosa. El tampón lava el complejo, la superficie porosa (por ejemplo rejilla) y sus agujeros y elimina las partículas marcadoras no unidas, disminuyendo de este modo la señal de fondo. Dado que la eficiencia de la técnica de ensayo depende parcialmente de la completitud de la separación entre material unido y no unido, la etapa de lavado es más efectiva cuando más fluido de lavado está en contacto con los componentes de unión. La completitud del lavado disminuye la señal de fondo presente, donde el material no unido que genera señales permanece en la zona de medición. Las ventajas de usar una rejilla metálica como superficie porosa es que el material tiene intrínsecamente muy poca fluorescencia de fondo y la unión inespecífica de partículas marcadoras así como de constituyentes de la muestra sobre la rejilla es pequeña.

La presente invención comprende un método genérico de alcanzar un método de separación único. Dicho método de separación consta en la práctica de una separación tanto bidimensional como tridimensional. El material, tal como un primer componente de unión y primer y segundo complejos de unión que no pasan a través de las aberturas (agujeros) de la superficie porosa (por ejemplo rejilla) debido a su mayor tamaño, se mueve en un plano en plano, por ejemplo se separa de forma bidimensional. Otro material, tal como el segundo componente de unión en exceso, material no deseado que puede causar unión inespecífica y que es lo suficientemente pequeño para pasar a través de las aberturas, aprovecha una ruta tridimensional. Esto permite que un inmunocomplejo/complejo biomolecular (primero y segundo de unión) puro se establezca sobre la superficie porosa.

Por consiguiente, la separación de inmunocomplejo/complejo biomolecular unido de material no unido se consigue usando dicha superficie donde la separación se produce principalmente de forma bidimensional sobre la superficie. Curiosamente, la superficie desvelada permite una separación donde dichos complejos se distribuyen de forma bidimensional sobre la superficie, mientras que los materiales no unidos se distribuyen de forma tridimensional. Por consiguiente, dicho método permite una separación tanto bidimensional como tridimensional. Esta característica distingue muy claramente la presente invención de la técnica anterior conocida. Dicha característica permite, cuando sea necesario, la liberación y transferencia de complejos desde la superficie de la superficie porosa (por ejemplo rejilla). Otra ventaja importante de este método de separación es que no son necesarios medios adicionales, por ejemplo un imán que se emplea cuando se usan perlas magnéticas, para la separación. De acuerdo con la presente invención, la separación se produce sobre una superficie, es decir sobre el montaje de prueba o de ensayo, que como tal ya se considera que es una herramienta básica para realizar un ensayo. La ventaja de usar dicha superficie para la separación de inmunocomplejo/complejo biomolecular es la baja unión a marcador inespecífico y, por lo tanto, la elevada relación de señal con respecto a ruido. También es ventajoso seleccionar un material de superficie que no se une de forma no específica a un marcador o partículas marcadoras.

Además, la separación tridimensional que usa una superficie porosa puede hacerse más rápida y más eficiente aplicando la superficie porosa sobre la superficie de un miembro, matriz o cualquier otro tipo de membrana o filtro con acción de capilaridad. Siendo el objetivo permitir el flujo de fluidos que contienen material no unido a través de la superficie porosa (por ejemplo rejilla). También puede usarse material que comprende una capa de gel debajo de la superficie porosa para recoger el material no unido para mejorar las características de la superficie porosa.

Un ensayo que aprovecha una membrana tridimensional clásica depende de la separación de material unido del no unido, donde parte del material unido está unido dentro de la membrana y parte sobre la superficie de la membrana. La presente invención depende de una separación de material unido y no unido, donde el material unido está unido

sobre la superficie porosa. En la práctica, esto significa que la mayoría de los primeros componentes de unión se extiende por encima de la superficie porosa y solamente una parte secundaria, si hay alguna, está en las aberturas o los agujeros de la superficie porosa. Dicha distribución depende en gran medida del diámetro de los agujeros y el tamaño de las partículas. Las partículas pueden aplicarse sobre la superficie porosa (por ejemplo rejilla) como monocapa bicapa, o multicapa en el método de la invención.

Típicamente el método de ensayo usado es un ensayo no competitivo. El método de ensayo usado también puede aplicarse a un procedimiento de ensayo competitivo. En un ensayo no competitivo, se mide la intensidad de la señal, mientras que, en un ensayo competitivo, la disminución de la intensidad de la señal.

De acuerdo con el método de la presente invención, todas las inmunorreacciones pueden llevarse a cabo secuencial o simultáneamente en un tubo o cubeta o directamente sobre la superficie de la rejilla. Típicamente, el tiempo de incubación total (ensayo) es de 1 a 5 minutos cuando todas las inmunorreacciones se llevan a cabo simultáneamente y de 3 a 15 minutos, respectivamente, cuando las inmunorreacciones se llevan a cabo secuencialmente. El método de ensayo puede requerir, sin embargo, más o menos tiempo que esto. El método es particularmente adecuado para analitos que tienen más de un sitio de unión específico.

El método de la invención se aplica generalmente a una muestra, típicamente una muestra biológica en el campo de enfermedades infecciosas, química clínica y monitorización de la higiene. Típicamente, la muestra es una de la que se sabe o se sospecha que es una muestra corporal de un individuo, tal como un ser humano. Preferentemente, la muestra comprende un fluido corporal por ejemplo sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, fluido de heridas cicatrizantes, líquido ascítico, líquido pleural, líquido sinovial, líquido de ampollas de succión de piel o líquido amniótico. Además, el método también es adecuado para poner a prueba muestras sólidas o semisólidas o pastosas solubles en agua tales como heces, esputo, faríngeas, pus y similares. Además, el método puede aprovecharse en monitorización de la higiene en la industria alimentaria y otras, así como hospitales, laboratorios etc.

El método descrito puede usarse para la separación de inmunocomplejos y, por lo tanto, para la detección de microorganismos como bacterias, virus, hongos y parásitos (protozoos) y sus antígenos así como células eucariotas y sus antígenos. Adicionalmente, pueden determinarse los siguientes tipos de analitos: hormonas, fármacos, toxinas, vitaminas, productos químicos medioambientales, enzimas, péptidos, proteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, lípidos, haptenos, alérgenos y ácidos nucleicos. El método descrito también puede usarse para la separación y el análisis de otros tipos de complejos biomoleculares como por ejemplo complejos entre ácidos nucleicos (ADN-ADN y ADN-ARN) y entre ácidos nucleicos y proteínas (por ejemplo complejos reguladores que controlan la expresión génica). Dichos complejos biomoleculares comprenden también otros tipos de complejos entre diferentes proteínas (incluyendo glucoproteínas y lipoproteínas) como complejos entre ligando y receptor (receptor unido a membranas de células completas o a membranas celulares separadas), complejos multienzimáticos (que comprenden diferentes subunidades enzimáticas) así como complejos entre proteínas y otros tipos de biomoléculas como complejos entre una enzima y su sustrato. El analito puede estar libre de antígenos celulares (por ejemplo ácido nucleico o proteína citoplasmática) o unido a una membrana de célula procariota o eucariota (por ejemplo receptores).

La invención también proporciona un kit para detectar la presencia y/o cantidad de un analito en una muestra. Además de una superficie porosa y un primer y segundo componentes de unión, los kits de la invención pueden comprender un tampón adecuado, un reactivo de calibración adecuado, una membrana con acción de capilaridad, un dispositivo de muestreo, instrucciones de uso y otros componentes habituales.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. A no ser que se indique lo contrario, los métodos usados son técnicas convencionales de bioquímica y biología molecular. Los ejemplos presentados son ejemplos solamente y no pretenden limitar el alcance de la invención.

El material de las rejillas metálicas usadas en la presente invención para separación del inmunocomplejo y el montaje del ensayo era cobre. El grosor de las rejillas usadas era de aproximadamente 10 μm con un grosor de barra de 5 μm y mostraban un tamaño del agujero de 7,5 μm (malla 2000). Las rejillas usadas en la presente invención son similares a las usadas en microscopía electrónica como el soporte (sujetador) de la muestra.

Ejemplo 1

Procedimiento para ensayo secuencial de hCRP con sustancia de unión unida a primera y segunda partículas que aprovecha fragmentos F(ab')_2 -policlonales y que mide la formación de inmunocomplejo sobre la rejilla usada para la separación de dicho complejo (figura 4).

Los ensayos con proteína C-reactiva humana (hCRP) se usan como un indicador de inflamación. En el presente ejemplo la hCRP se determinó en una muestra calibradora. En primer lugar, una muestra que contiene hCRP a una concentración entre 0 - 10 mg/l y 0,1 ml del tampón (a base de Tris) se añaden a pequeños tubos de centrifuga.

Seguidamente, se añaden 10 µl de partículas de látex al 0,25% (diámetro 10 µm) revestidas con fragmento anti-CRP F(ab')₂ y los tubos se incuban durante 5 minutos con mezclado. Después de la incubación, los tubos se centrifugan durante 0,5-3 minutos (aproximadamente 16000 x g) y los sobrenadantes se desechan. A continuación se lavan partículas de látex con CRP unida para eliminar la CRP no unida por medio de centrifugado y aspiración. Las partículas se suspenden de nuevo en 0,1 ml de tampón y se añaden 10 µl de marcador que contiene partículas de látex revestidas con sustancia de unión (suspensión al 0,125%; diámetro de la partícula de látex 0,1 µm). Después de incubación durante 5 minutos el inmunocomplejo formado: látex de captura con primera sustancia de unión - CRP - látex marcador con la segunda sustancia de unión se separa transfiriendo los componentes de reacción sobre rejillas de 7,5 µm (diámetro del agujero) y se filtra a través de dichas rejillas (diámetro 3 mm). El proceso de filtración se describe en las figuras 2 y 3. Después del lavado, se cuenta la señal de fluorescencia del inmunocomplejo unido a la rejilla. La señal se correlaciona con la cantidad de inmunocomplejo sobre la rejilla y, por lo tanto, con la cantidad de CRP en dicho complejo y, en consecuencia, con la cantidad de analito en la muestra.

Ejemplo 2

Procedimiento para ensayo secuencial de hSHBG con sustancia de unión unida a primera y segunda partículas que aprovecha anticuerpos monoclonales y que mide la formación de inmunocomplejos sobre la rejilla usada para la separación de dicho complejo (figura 5).

Se usan ensayos de globulina fijadora de hormonas sexuales humana (hSHBG) como un indicador del estado hormonal. En el presente ejemplo, se determinó la hSHBG recombinante en una muestra de medio de cultivo celular. En primer lugar, se añaden una muestra que contiene hSHBG a una concentración entre 0 - 200 nmol/l y 0,1 ml del tampón a tubos de centrifuga pequeños. Seguidamente, se añaden 10 µl de partículas de látex al 0,25% (diámetro 10 µm) revestidas con anticuerpo monoclonal anti-SHBG y los tubos se incuban durante 5 minutos con mezclado. Después de la incubación, los tubos se centrifugan durante 0,5-3 minutos (aproximadamente 16000 x g) y los sobrenadantes se desechan. A continuación, se lavan partículas de látex con SHBG unida para eliminar la SHBG no unida por medio de centrifugado y aspiración. Las partículas se suspenden de nuevo a 0,1 ml de tampón y se añaden 10 µl de marcador que contenía partículas de látex revestidas con sustancia de unión (suspensión al 0,125%; diámetro de la partícula de látex 0,1 µm). Siendo la sustancia de unión un anticuerpo monoclonal con diferente especificidad para SHBG que la primera sustancia de unión. Después de incubación durante 5 minutos, el inmunocomplejo formado: látex de captura con primera sustancia de unión - SHBG - látex marcador con la segunda sustancia de unión se separa transfiriendo los componentes de reacción sobre rejillas de 7,5 µm (diámetro del agujero) y se filtra a través de dichas rejillas (diámetro 3 mm). El proceso de filtración se describe en las figuras 2 y 3. Después del lavado, se cuenta la señal de fluorescencia del inmunocomplejo unido a la rejilla. La señal se correlaciona con la cantidad de inmunocomplejo sobre las rejillas y, por lo tanto, con la cantidad de SHBG en dicho complejo y, en consecuencia, con la cantidad de analito en la muestra.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia o cantidad de un analito en una muestra, comprendiendo dicho método:

- 5 (a) aplicar a una superficie porosa un primer componente de unión que comprende partículas que tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente a dicho analito;
- (b) aplicar dicha muestra a dicha superficie porosa;
- (c) aplicar a dicha superficie porosa un segundo componente de unión que comprende partículas marcadas de forma detectable; y
- 10 (d) detectar una señal producida por dichas partículas marcadas de forma detectable sobre dicha superficie porosa que es indicativa de la presencia y/o la cantidad de dicho analito en dicha muestra;

donde dicha superficie porosa es una rejilla o una parrilla;

- 15 donde dicha superficie porosa permite que dicho segundo componente de unión, pero no que dicho primer componente de unión, pase a través de dicha superficie;
- donde dicho primer componente de unión y dicho analito se unen entre sí para formar un primer complejo de unión;
- donde dichas partículas marcadas de forma detectable tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente a dicho analito o dicho primer componente de unión y dicho analito, de modo que dicho segundo componente de unión y dicho primer complejo de unión se unen entre sí para formar un segundo complejo de unión;
- 20 y
- donde el primer complejo de unión y/o el segundo complejo de unión es retenido sobre la superficie porosa.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la muestra y el primer componente de unión se ponen en contacto entre sí antes de ser aplicados a la superficie.

- 25 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa (a) se lleva a cabo antes que la etapa (b).
- 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la muestra, el primer componente de unión y el segundo componente de unión se ponen en contacto entre sí antes de ser aplicados a la superficie porosa.

5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además aplicar a dicha superficie antes de la etapa (d) una solución de lavado capaz de pasar a través de dicha superficie porosa.

6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho segundo componente de unión comprende partículas marcadas de forma detectable que tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente a dicho analito.

7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha superficie porosa comprende:

- 40 (a) un material que es metal, plástico, cerámica, vidrio o silicio; y/o
- (b) un dispositivo de separación.

8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha superficie porosa comprende un formato tanto bidimensional como tridimensional.

9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las partículas del primer componente de unión o el segundo componente de unión:

- 50 (a) comprenden un material que es un polímero sintético, plástico, vidrio, metal o celulosa; o
- (b) son liposomas, células o microorganismos.

10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las partículas del primer componente de unión tienen un diámetro promedio más grande que las partículas del segundo componente de unión.

11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde

- 60 a) las partículas del primer componente de unión tienen un diámetro promedio de 0,1 a 200 μm ; y/o
- b) las partículas del segundo componente de unión tienen un diámetro promedio de 1 a 1000 nm.

12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la superficie porosa comprende aberturas/agujeros con dos lados paralelos y la distancia entre los lados paralelos es más pequeña que el diámetro promedio de las partículas del primer componente de unión.

65

13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha sustancia de unión está unida de forma adsorptiva o de forma covalente a dichas partículas en una cantidad suficiente para revestir sustancialmente las partículas.
- 5 14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha sustancia de unión comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal o fragmentos F(ab') o F(ab')₂ de los mismos.
15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichas partículas se marcan de forma detectable usando un material que es un material luminiscente, radiomarcado, cromógeno o magnético.
- 10 16. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho analito es un antígeno, opcionalmente proteína C-reactiva (CRP) o globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG).
- 15 17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha superficie porosa tiene una naturaleza pasiva en la recogida de dichos complejos y opcionalmente tiene un papel activo en la generación y/o la conducción de señales, así como en la eliminación de marcador no unido.
18. Un kit para detectar la presencia y/o cantidad de un analito en una muestra que comprende:
- 20 (a) una superficie porosa;
- (b) un primer componente de unión que comprende partículas que tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente a dicho analito para formar un primer complejo de unión; y
- (c) un segundo componente de unión que comprende partículas marcadas de forma detectable que tienen fijada a ellas una sustancia de unión que se une específicamente a dicho analito o dicho primer componente de unión y
- 25 dicho analito, de modo que dicho segundo componente de unión y dicho primer complejo de unión se unen entre sí para formar un segundo complejo de unión;
- donde dicha superficie porosa es una rejilla o una parrilla;
- donde el primer complejo de unión y/o el segundo complejo de unión son capaces de ser retenidos sobre la
- 30 superficie porosa.
19. Un kit de acuerdo con la reivindicación 18, donde dicha superficie porosa tiene una naturaleza pasiva en la recogida de dichos complejos y opcionalmente tiene un papel activo en la generación y/o la conducción de señales, así como en la eliminación del marcador no unido.

Figura 1.

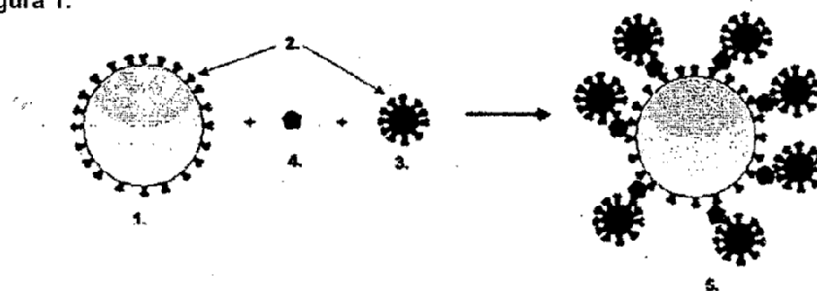


Figura 2.

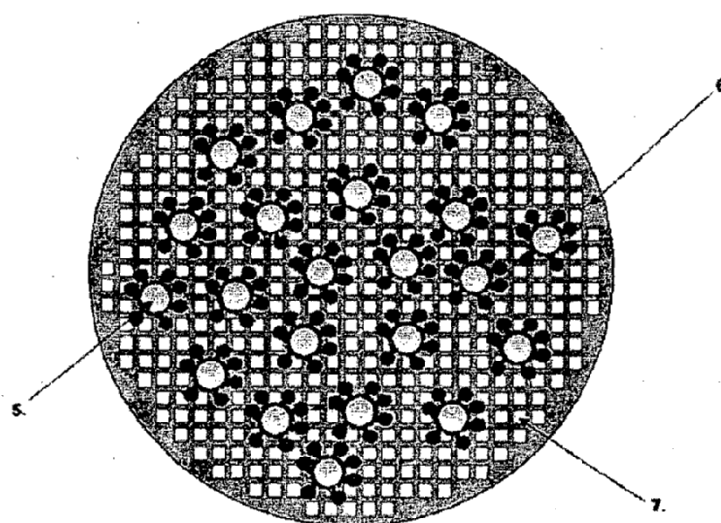
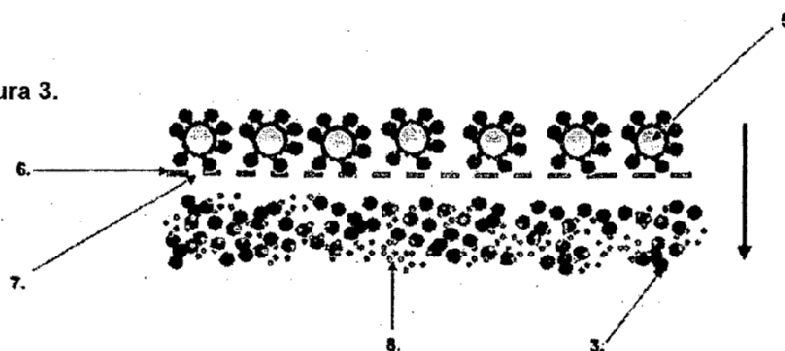


Figura 3.



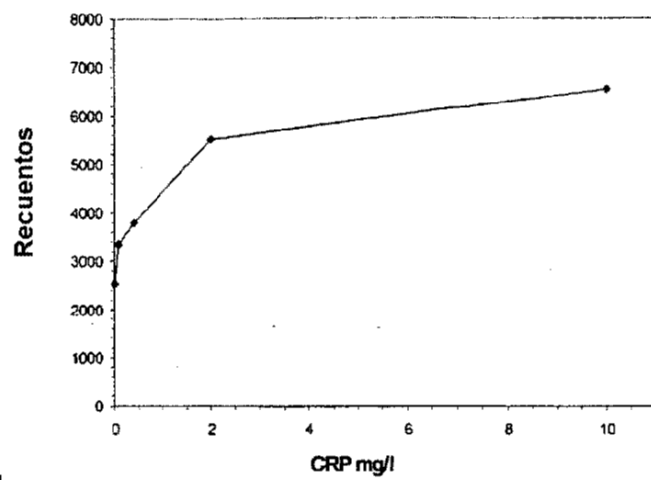


Figura 4.

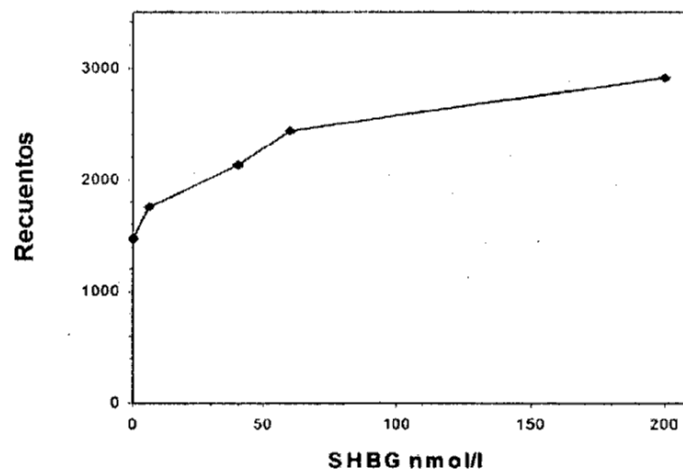


Figura 5.

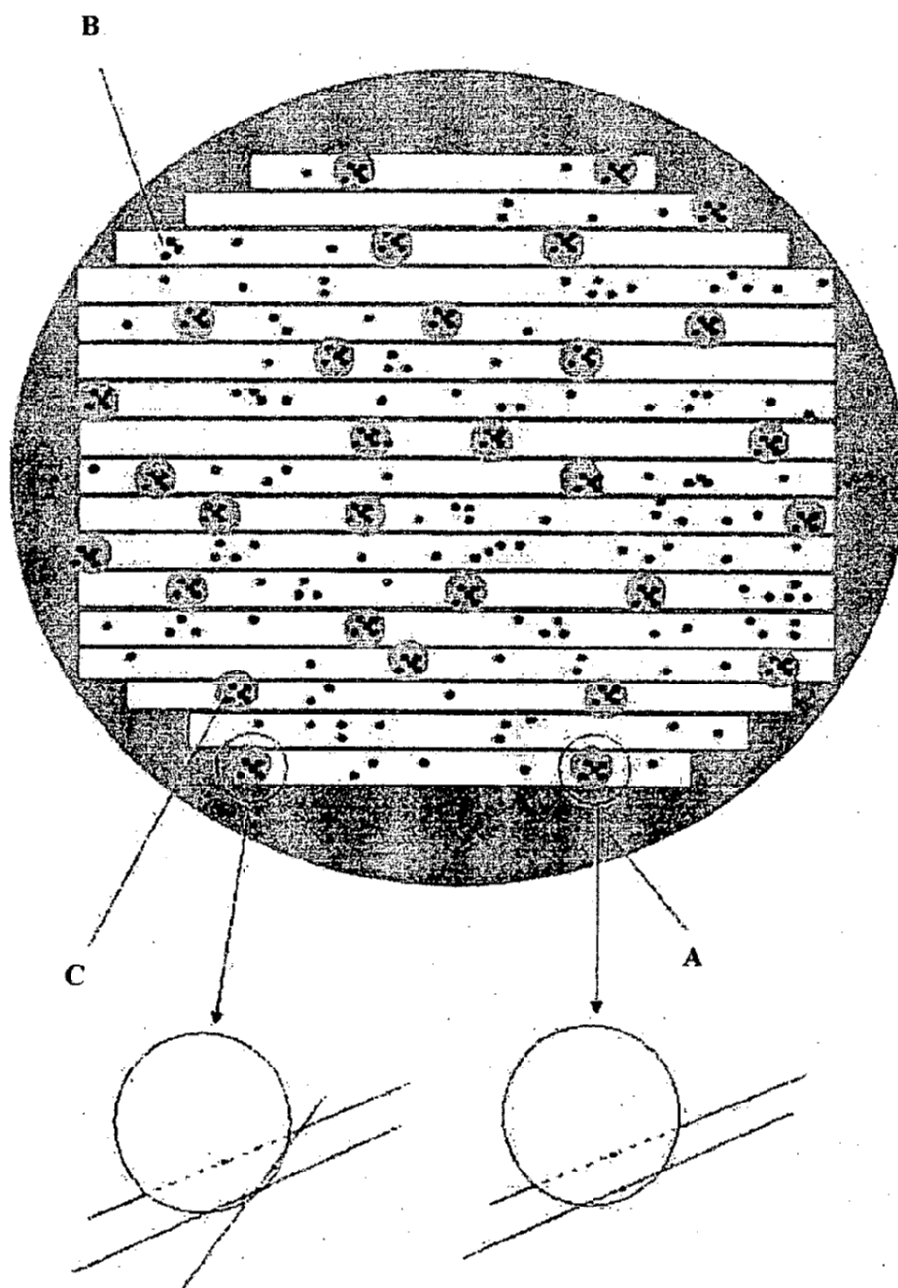


Figura 6.

• = D